

系球体足細胞特異的Ext13欠損マウスを用いた系球体チャージバリアに関する検討

著者	青木 聡
号	86
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	医博第3589号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00123270

氏名	あおき さとし 青木 聡
学位の種類	博士(医学)
学位授与年月日	平成29年3月24日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科(博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	糸球体足細胞特異的 <i>Extl3</i> 欠損マウスを用いた 糸球体チャージバリアに関する検討
論文審査委員	主査 教授 伊藤 貞嘉 教授 菅原 明 教授 上月 正博 教授 藤原 幾磨

論文内容要旨

1) 背景

ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG; heparan sulphate proteoglycan) は、生体内において様々な組織の細胞表面や細胞外基質に存在する直鎖状構造の多糖である。HSPGは糸球体基底膜 (GBM; glomerular basement membrane) の主要な構成成分である。糸球体係蹄壁は、内皮細胞、GBM、足突起で結合した足細胞の3層構造からなり、物質濾過におけるサイズバリアとチャージバリアを担う。この選択的濾過機構により、正常な状態でアルブミンは尿中へほとんど濾過されない。HSPGはGBMに豊富であり陰性電荷を有することから、糸球体チャージバリアにおいて中心的な役割をはたすと考えられてきた。蛋白尿を呈する種々の腎疾患において、糸球体におけるHSPGの減少や構造変化が生じることが分かっている。しかし、尿蛋白漏出との因果関係はまだはっきりしておらず、否定的な報告も少なくない。

2) 目的

新たに作成した糸球体足細胞特異的 *Extl3* 欠損マウス (*Extl3KO*) において、段階別の糸球体負荷を与えることで、GBMにおけるヘパラン硫酸低下が尿アルブミン漏出へ与える影響を明ら

(書式12)

かにする。

3) 方法

今回我々は、Cre-loxP部位特異的組み換えシステムによって*Extl3KO*を作成した。すなわち、nephrin (NPHS1) プロモーターに隣接してCreリコンビナーゼを発現した*Nphs1-Cre*マウスと、*lox*配列をもつ*Extl3^{lox/lox}*マウスを交配させることで、糸球体足細胞選択的な*Extl3*のノックアウトをおこなった。GBMのヘパラン硫酸 (HS; heparan sulphate) は主に足細胞で合成され、EXTL3はHS合成に関与する酵素であることから、同マウスではGBMにおけるHSPGの低下が期待できる。糸球体に対する負荷強度別にマウスを3群に分け、尿アルブミン・クレアチニン比 (UACR) を7、11、15、19週齢で測定した。併せて腎臓の組織学的な評価もおこなった。

4) 結果

腎組織の免疫染色 (酵素抗体法) により、*Extl3KO*における糸球体足細胞特異的なCreリコンビナーゼの発現が確認された。また、蛍光抗体法により、*Extl3KO*の糸球体におけるHSPGの低下が証明された。電子顕微鏡画像上、*Extl3KO*では不整なGBMや足細胞の融合が認められた。UACRの値は、コントロールと*Extl3KO*間で差がなく、いずれの負荷においても微量アルブミン尿の範囲内であった。

5) 結論

Extl3KO を用いた検討により、GBM における HSPG の低下は、尿アルブミン漏出を増加させないことが分かった。HSPG は、糸球体チャージバリアにおける主要な寄与因子ではないと考えられた。

審査結果の要旨

博士論文題名：糸球体足細胞特異的 *Extl3* 欠損マウスを用いた糸球体チャージバリアに関する検討

所属専攻・分野名 医科学 専攻 腎・高血圧・内分泌学分野

学籍番号 B3MD5001 氏名 青木 聡

ヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPG; heparan sulphate proteoglycan）は、生体内において様々な組織の細胞表面や細胞外基質に存在する直鎖状構造の多糖である。HSPGは糸球体基底膜（GBM; glomerular basement membrane）の主要な構成成分である。HSPGはGBMに豊富であり陰性電荷を有することから、糸球体チャージバリアにおいて中心的な役割をはたすと考えられてきた。しかし、尿蛋白漏出との因果関係はまだはっきりしておらず、否定的な報告も少なくない。本研究では、糸球体足細胞特異的 *Extl3* 欠損マウス（*Extl3KO*）を作成し、GBMにおけるヘパラン硫酸低下が尿アルブミン漏出へ与える影響を検討した。GBMのヘパラン硫酸（HS; heparan sulphate）は主に足細胞で合成され、EXTL3はHS合成に関与する酵素であることから、同マウスではGBMにおけるHSPGの低下が期待できる。糸球体に対する負荷強度別にマウスを3群に分け、尿アルブミン・クレアチニン比（UACR）を7、11、15、19週齢で測定した。併せて腎臓の組織学的な評価もおこなった。腎組織の免疫染色（酵素抗体法）や蛍光抗体法により、*Extl3KO*の糸球体におけるHSPGの低下が確認され、電子顕微鏡画像上、*Extl3KO*では不整なGBMや足細胞の融合が認められた。しかし、UACRの値は、コントロールと*Extl3KO*間で差がなく、いずれの負荷においても微量アルブミン尿の範囲内であった。以上より、HSPGは、糸球体チャージバリアにおける主要な寄与因子ではないと考えられた。本論分は尿蛋白の発症メカニズムを考える上で極めて重要な所見である。方法や考察も適切であり、よって、本論文は博士(医学)の学位論文として、合格と認める。